

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

BEST AVAILABLE COPY

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09072901 A**

(43) Date of publication of application: **18.03.97**

(51) Int. Cl

G01N 33/50
G01N 33/576
// G01N 33/53

(21) Application number: **07225580**

(71) Applicant: **NIPPON DPC CORP**

(22) Date of filing: **01.09.95**

(72) Inventor: **KOIKE TAKAO**

(54) **EVALUATION METHOD FOR LIVER DISEASES**

(e.g. determination of possibility of deteriorating liver disease), concentration of soluble Fas antigen in the blood is measured. The liver diseases include chronic hepatitis, cirrhosis and primary carcinoma.

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To grasp a patient having high possibility of deteriorating liver disease in early stage by predicting a patient having high possibility of transition from chronic liver disease to cirrhosis and primary carcinoma of liver and taking countermeasures for suppressing deterioration of liver disease.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

SOLUTION: In the method for evaluating liver disease

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-72901

(43) 公開日 平成9年(1997)3月18日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/50			G 0 1 N 33/50	T
		33/576	33/576	Z
// G 0 1 N 33/53			33/53	D

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 3 頁)

(21) 出願番号 特願平7-225580

(22) 出願日 平成7年(1995)9月1日

(71) 出願人 594168654

ニッポン・ディーピーシー・コーポレーション

アメリカ合衆国カリフォルニア州ロスアン
ジェルズ市ウエスト ナインティ シック
ス ストリート 5700

(72) 発明者 小池 隆夫

北海道札幌市中央区北2条西18丁目1-2
パークハウス北2条1001号

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 肝疾患群の評価法

(57) 【要約】

【課題】 慢性肝疾患から肝硬変、原発性肝癌へと移行する可能性の高い患者を予め予見し、対策を講じることにより肝疾患の悪化を押さえる為に、肝疾患悪化の可能性が高い患者を早期に把握することを課題とする。

【解決手段】 肝疾患群の評価法（肝疾患の進行の危険率の決定等）において、血中の可溶性 F a s 抗原の濃度を測定する。肝疾患群としては慢性肝炎、肝硬変、または原発性肝癌である。

PTO 2002-4894

S.T.I.C. Translations Branch

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血中の可溶性Fas抗原の濃度を測定することを特徴とする肝疾患群の評価法。

【請求項2】 肝疾患群が慢性肝炎、肝硬変、または原発性肝癌である請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記評価が肝疾患の進行の危険率の決定である請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は慢性肝炎、肝硬変、原発性肝癌等の肝疾患の検知法に関する。また本発明は、継続的に測定することにより肝疾患の病状の指標となる検知法に関する。また慢性肝炎から肝硬変、原発性肝癌と移行する可能性を推測する検知法に関する。

【0002】

【従来技術】近年アポトーシス (apoptosis) という細胞の自殺現象のメカニズムが解明されてきており、そのメカニズムにおいてFas抗原という蛋白質が注目を浴びている。Fas抗原は胸腺細胞や活性化T細胞などのリンパ系細胞、心臓、肝臓、腎臓などに発現されており、細胞表面にFas抗原が提示されることにより、アポトーシスが起るとされている。

【0003】最近、劇症肝炎など一部の肝細胞死にFas抗原が関与している可能性が動物実験で示唆されているが、肝疾患による肝細胞死にアポトーシスが関与しているとの推察から、肝疾患の検出のために肝細胞中のFas抗原を測定することは考えられている。

【0004】一方上記の細胞膜に組み込まれたFas抗原とは別に可溶性のものが1994年に発見され (J. Chengら (1994) SCIENCE vol. 263 p1759) 、soluble-Fas antigen (本明細書において、「可溶性Fas抗原」とする。) と命名されている。

【0005】現在この可溶性Fas抗原の血清中濃度と自己免疫疾患、特に全身性エリテマトーデスの活動性との関係が示唆されている。また可溶性Fas抗原はアポトーシスを阻害する機構が推察されており、生体内において膜結合型Fas抗原とは全く異なった役割を持っていると考えられている。従って肝疾患と関連するという報告はない。

【0006】ところで慢性肝炎、肝硬変、原発性肝癌などの肝疾患は肝細胞が破壊されていく、非常に重篤な疾患である。慢性肝炎は主にウイルス感染が原因とされ、アルコールの多飲もその一助となることは周知である。慢性肝炎患者の約25%は肝硬変へと移行し、さらにその内約70%は原発性肝癌へと移行することが知られている。

【0007】現在慢性肝炎、肝硬変、原発性肝癌などの肝疾患検査は数多くあり、生化学的肝機能検査は、胆汁、色素排泄、酵素、血漿蛋白、脂質などの代謝検査に大別される。また種々の肝疾患により特異的な検査とし

2

てウイルス関連検査や、IV型コラーゲン、PIIIP、プロリンヒドロキシラーゼ (Proline Hydroxylase) 、ヒアルuron酸などの線維化マーカー、そしてAFPやPIVKAIIなどの癌マーカーが挙げられる。またより直接的なものとして超音波エコー、肝生検、腹腔鏡による検査もある。そしてこれらの検査を組み合わせる肝疾患診断を行う。これらの診断法は種々の肝疾患の可能性のある患者をスクリーニングしたり、慢性肝炎から肝硬変、原発性肝癌へと肝疾患が悪化する場合のモニタリングに使用されることが多い。

【0008】しかしながら、このように肝疾患に関する検査は数多く存在するものの、肝疾患が悪化する可能性を予測するための検出テストは存在しなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】そこで本発明では慢性肝疾患から肝硬変、原発性肝癌へと移行する可能性の高い患者を予め予見し、対策を講じることにより肝疾患の悪化を押さえる為に、肝疾患悪化の可能性が高い患者を早期に把握することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために検討を行った結果、血清中の可溶性Fas抗原濃度と肝疾患との間の関連性を見だし本発明に至った。すなわち、本発明は、血中の可溶性Fas抗原の濃度を測定することを特徴とする肝疾患群の評価法である。肝疾患群には、慢性肝炎、肝硬変及び原発性肝癌が含まれる。

【0011】前記の評価は、評価対象者の血中の可溶性Fas抗原の濃度を、肝疾患患者及び/または正常人について収集された血中の可溶性Fas抗原濃度と比較することにより行うことができる。

【0012】前記評価は、肝疾患の罹患危険率の決定として、あるいは肝疾患の進行の危険率の決定として行うことができる。後記実施例に示すように、肝疾患患者について血清中の可溶性Fas抗原の濃度を測定したところ、慢性肝炎では25%、肝硬変では33%、原発性肝癌患者では50%が有意に可溶性Fas抗原の血中濃度が高かった。従って、血中の可溶性Fas抗原を測定することにより、肝疾患の罹患の危険率を決定することができる。また、肝疾患の進行の危険率を決定することもできる。肝疾患の進行には、慢性肝炎から肝硬変、慢性肝炎から原発性肝癌、肝硬変から原発性肝癌への移行がある。

【0013】

【発明の実施の形態】次に、本発明の実施の態様を説明する。本発明の方法は、血中の可溶性Fas抗原の濃度を測定することにより行われる。検体としては、血清、血漿、全血、濾紙血、または、唾液が用いられるが、可溶性物質を含む分画物を用いても良い。

【0014】可溶性Fas抗原の濃度の測定の方法は、

10

20

30

40

50

特に制限されず、絶対値として測定しても、標準物質に対する相対値としても良い。具体的には、可溶性Fas抗原に対する抗体を用いたRIA（放射免疫測定）、EIA（酵素免疫測定）、FIA（傾向免疫測定）、CLIA（化学発光免疫測定）、CLEIA（化学発光酵素免疫測定）または、免疫凝集法等、通常の免疫測定法が挙げられる。

【0015】前記抗体は、例えば、可溶性Fas抗原でマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、モルモット、ヒツジなどの動物を免疫することにより、これらの動物から抗血清として、得られる。得られた血清をさらにイムノグロブリン、またはIgGに精製してもよく、さらに、可溶性Fasなどをもちいてアフィニティー精製してもよい。免疫に用いる可溶性Fas抗原は、人血清などから精製してもよいが、遺伝子組み替え技術を用いて大腸菌や培養細胞から得ることもできるし、アミノ酸配列の一部または全部を含む合成ペプチドも使用可能である。

【0016】また、抗体としてモノクローナル抗体を調製しても良い。例えば、可溶性Fasで免疫したマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞と細胞融合させてハイブリドマを調製し、得られたハイブリドマから可溶性Fas抗原に結合する抗体を産生する株式会社を選択し、得られた株を好適な培地で培養すると、培養液中に可溶性Fas抗原に対するモノクローナル抗体が産生される。尚、免疫測定法としてサンドイッチ法を用いる場合には、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を組み合わせる用いるか、あるいは異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体を用意する。このような抗*

*体として、(株)医学生物学研究所から市販されている抗Fas抗体も使用可能である。

【0017】予め同定されている肝疾患患者及び正常者について上記のようにして中の可溶性Fas抗原濃度を測定しておき得られたデータと、評価対象者の血中可溶性Fas抗原濃度を比較し、評価を行う。

【0018】

【実施例】対象には慢性肝炎12例、肝硬変15例、原発性肝癌34例、健常人40例の血清を用いた。

10 【0019】血清中可溶性Fas抗原は、Fas抗原の細胞外ドメインの異なるエピトープに対する2種類のモノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISA法により測定した。可溶性Fas抗原濃度は、可溶性Fas抗原cDNAを組み込んだ発現ベクターを導入したCOS-7細胞の培養上清から、可溶性Fas抗原の標準直線を作成して求めた。

【0020】

20 【測定結果】結果は表1の通りであった。Mann-Whitney's U-testではそれぞれの肝疾患群では有意差はみられなかったが、健常人と各肝疾患との間にはいずれも有意差($p < 0.001$)が認められた。次に可溶性抗原の陽性率を求めると、健常人の平均 $\pm 3SD (= 0.97 \text{ ng/ml})$ を越える症例は表2の通りであった。この結果より特に原発性肝癌において可溶性Fas抗原の陽性率が高かった。

【0021】

【表1】

表1 各種肝疾患での可溶性Fas抗原値

慢性肝炎	0.96 \pm 0.76(0.31~ 3.01)ng/ml
肝硬変	1.26 \pm 1.45(0.20~ 5.21)ng/ml
原発性肝癌	2.69 \pm 3.48(0.03~12.50)ng/ml
健常人	0.22 \pm 0.25(0.0 ~ 1.33)ng/ml

【0022】

【表2】

表2 各種肝疾患での陽性率

慢性肝炎	3/12 (25%)
肝硬変	5/15 (33%)
原発性肝癌	17/34 (49%)

【0023】

【発明の効果】以上より、慢性肝炎、肝硬変、原発性肝癌では健常人より血中可溶性Fas抗原が有意に増加しており、特に原発性肝癌の50%が可溶性Fas抗原陽性を示した。白血病患者では血中可溶性Fas抗原レベルの上昇が報告されており、腫瘍細胞や変異細胞が、F ※

※ a s リガンド陽性細胞などの免疫学的監視機構から逃れるメカニズムの一つとして可溶性Fas抗原が機能していることが考えられる。従って各種肝疾患における血中可溶性Fas抗原の測定が原発性肝癌の早期診断または肝疾患進行の危険群の発見に役立ち、その測定意義は臨床的に重要である。

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19)[ISSUINGCOUNTRY] Japanese Patent Office (JP)
(12)【公報種別】 公開特許公報 (A)	Laid-open (Kokai) patent application number (A)
(11)【公開番号】 特開平 9 - 7 2 9 0 1	(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER] Unexamined-Japanese-Patent 9-72901
(43)【公開日】 平成 9 年 (1 9 9 7) 3 月 1 8 日	(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION] March 18th, Heisei 9 (1997)
(54)【発明の名称】 肝疾患群の評価法	(54)[TITLE] The evaluation method of a hepatic-disorders group
(51)【国際特許分類第 6 版】 G01N 33/50 33/576 // G01N 33/53	(51)[IPC] G01N33/5033/576//G01N33/53
【 F I 】 G01N 33/50 T 33/576 Z 33/53 D	[FI] G01N33/50 T 33/576 Z 33/53 D
【審査請求】 未請求	[EXAMINATIONREQUEST] UNREQUESTED
【請求項の数】 3	[NUMBEROFCLAIMS] Three
【出願形態】 O L	[Application form] OL
【全頁数】 3	[NUMBEROFPAGES] Three
(21)【出願番号】 特願平 7 - 2 2 5 5 8 0	(21)[APPLICATIONNUMBER] Japanese-Patent-Application-No. 7-225580
(22)【出願日】	(22)[DATEOFFILING]

平成 7 年 (1 9 9 5) 9 月 1 日 September 1st, Heisei 7 (1995)

(71) 【出願人】 (71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

5 9 4 1 6 8 6 5 4

[IDCODE]

594168654

【氏名又は名称】

ニッポン・ディーピーシー・コ
ーポレーション Japan DPC Corporation

【住所又は居所】

アメリカ合衆国カリフォルニア
州ロスアンジェルス市ウエスト
ナインティ シックス ス
トリート 5 7 0 0

[ADDRESS]

(72) 【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 小池 隆夫

Takao Koike

【住所又は居所】

北海道札幌市中央区北 2 条西 1
8 丁目 1 - 2 パークハウス北 2
条 1 0 0 1 号

[ADDRESS]

(74) 【代理人】

(74)[PATENTAGENT]

【弁理士】

[PATENTATTORNEY]

【氏名又は名称】

遠山 勉 (外 2 名)

Tsutomu Toyama (et al.)

(57) 【要約】

(57)[SUMMARY]

【課題】

慢性肝疾患から肝硬変、原発性
肝癌へと移行する可能性の高い
患者を予め予見し、対策を講じ

[SUBJECT]

The patient with high possibility of transferring
from chronic hepatic disorders to a liver
cirrhosis and a primary hepatic carcinoma is

ることにより肝疾患の悪化を押さえる為に、肝疾患悪化の可能性が高い患者を早期に把握することを課題とする。

【解決手段】

肝疾患群の評価法（肝疾患の進行の危険率の決定等）において、血中の可溶性 Fas 抗原の濃度を測定する。肝疾患群としては慢性肝炎、肝硬変、または原発性肝癌である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血中の可溶性 Fas 抗原の濃度を測定することを特徴とする肝疾患群の評価法。

【請求項 2】

肝疾患群が慢性肝炎、肝硬変、または原発性肝癌である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記評価が肝疾患の進行の危険率の決定である請求項 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は慢性肝炎、肝硬変、原発性肝癌等の肝疾患の検知法に関する。また本発明は、継続的

foreseen previously.

In order to suppress aggravation of hepatic disorders by devising a countermeasure, the patient with the high possibility of hepatic-disorders aggravation is grasped in its early stages. This is subjected.

[SOLUTION]

Concentration of blood soluble Fas antigen is measured in the evaluation method of a hepatic-disorders group (determination of the level of significance of advance of hepatic disorders etc.).

As a hepatic-disorders group, they are the chronic hepatitis, a liver cirrhosis, or a primary hepatic carcinoma.

[CLAIMS]**[CLAIM 1]**

A evaluation method of the hepatic-disorders group, in which concentration of blood soluble Fas antigen is measured.

[CLAIM 2]

The method of Claim 1 a hepatic-disorders group is the chronic hepatitis, a liver cirrhosis, or a primary hepatic carcinoma.

[CLAIM 3]

The method of Claim 1 the above-mentioned evaluation is determination of the level of significance of advance of hepatic disorders.

[DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION]**[0001]****[TECHNICAL FIELD]**

This invention relates to the detection method of hepatic disorders, such as the chronic hepatitis, a liver cirrhosis, and a primary hepatic

に測定することにより肝疾患の病状の指標となる検知法に関する。また慢性肝炎から肝硬変、原発性肝癌と移行する可能性を推測する検知法に関する。

carcinoma.

Moreover this invention relates to the detection method used as the index of the condition of disease of hepatic disorders by measuring continuously.

Moreover it is related with the detection method which assumes possibility of transferring to a liver cirrhosis and a primary hepatic carcinoma, from the chronic hepatitis.

【 0 0 0 2 】

[0002]

【従来技術】

近年アポトーシス (apoptosis) という細胞の自殺現象のメカニズムが解明されてきており、そのメカニズムにおいて F a s 抗原という蛋白質が注目を浴びている。F a s 抗原は胸腺細胞や活性化T細胞などのリンパ系細胞、心臓、肝臓、腎臓などに発現されており、細胞表面に F a s 抗原が提示されることにより、アポトーシスが起るとされている。

[PRIOR ART]

The mechanism of the suicide phenomenon of a cell called apoptosis (apoptosis) has been clarified in recent years.

A protein called Fas antigen is exposed to attention in the mechanism.

Fas antigen is expressed by lymphoid cells, such as a thymus cell and the activated T cell, the heart, the liver, the kidney, etc. It should be supposed by showing Fas antigen to the cell surface that apoptosis occurs.

【 0 0 0 3 】

最近、劇症肝炎など一部の肝細胞死に F a s 抗原が関与している可能性が動物実験で示唆されているが、肝疾患による肝細胞死にアポトーシスが関与しているとの推察から、肝疾患の検出テストに肝細胞中の F a s 抗原を測定することは考えられている。

[0003]

Possibility that Fas antigen is concerning in partial liver cell deaths, such as the fulminant hepatitis, recently is suggested by the animal experiment.

However, measuring Fas antigen in a hepatic cell in the detection test of hepatic disorders is being thought of from the guess that apoptosis is concerning in the liver cell death by hepatic disorders.

【 0 0 0 4 】

一方上記の細胞膜に組み込まれた F a s 抗原とは別に可溶性のものが 1 9 9 4 年に発見され (J.Cheng ら (1994) SCIENCE

[0004]

A soluble thing will be discovered apart from Fas antigen built into the cytoplasmic membrane of the above on the one side in 1994 (J. Cheng SCIENCE vol.263 (1994) p1759). It is named soluble-Fasantigen (in this

vol.263 p1759)、soluble-Fas antigen (本明細書において、「可溶性Fas抗原」とする。)と命名されている。

【0005】

現在この可溶性Fas抗原の血清中濃度と自己免疫疾患、特に全身性エリテマトーデスの活動性との関係が示唆されている。また可溶性Fas抗原はアポトーシスを阻害する機構が推察されており、生体内において膜結合型Fas抗原とは全く異なった役割を持っていると考えられている。従って肝疾患と関連するという報告はない。

【0006】

ところで慢性肝炎、肝硬変、原発性肝癌などの肝疾患は肝細胞が破壊されていく、非常に重篤な疾患である。慢性肝炎は主にウイルス感染が原因とされ、アルコールの多飲もその一助となることは周知である。慢性肝炎患者の約25%は肝硬変へと移行し、さらにその内約70%は原発性肝癌へと移行することが知られている。

【0007】

現在慢性肝炎、肝硬変、原発性肝癌などの肝疾患検査は数多くあり、生化学的肝機能検査は、胆汁、色素排泄、酵素、血漿蛋白、脂質などの代謝検査に大別される。また種々の肝疾患により特異的な検査としてウイルス関連検査や、IV型コラーゲン、PIIIP、プロリンヒドロキシラーゼ (Proline Hydroxylase)、ヒ

description, it considers as "soluble Fas antigen").

[0005]

The relationship with the activity of the concentration in a serum of this soluble Fas antigen, an autoimmune disease, in particular the systemic lupus erythematosus is suggested currently.

Moreover the mechanism that soluble Fas antigen obstructs apoptosis is imagined.

It is considered in the living body that it has the role which completely differed from the membrane-bound Fas antigen.

Therefore there is no report of being connected with hepatic disorders.

[0006]

Apart from that as for hepatic disorders, such as the chronic hepatitis, a liver cirrhosis, and a primary hepatic carcinoma, the hepatocyte is destroyed. It is the serious disease very.

As for the chronic hepatitis, mainly make a virus infection be a cause.

It is common knowledge that the polyposia of alcohol also makes the aid.

It transfers to a liver cirrhosis about 25% of a chronic-hepatitis patient.

Furthermore transferring 70% of them to a primary hepatic carcinoma is known.

[0007]

There are many hepatic-disorders tests of the chronic hepatitis, a liver cirrhosis, a primary hepatic carcinoma, etc. currently.

A biochemical liver-function test is divided roughly into a metabolism test of a bile, pigment excretion, an enzyme, a plasma protein, a lipid, etc.

As a specific test by various hepatic disorders again, virus related test, fibrosis markers, such as IV type collagen, PIIIP, a proline hydroxylase (ProlineHydroxylase), and hyaluronic acid, and an AFP and PIVKAll etc. cancer marker are

アルウロン酸などの線維化マーカー、そしてAFPやPIVKAIIなどの癌マーカーが挙げられる。またより直接的ものとして超音波エコー、肝生検、腹腔鏡による検査もある。そしてこれらの検査を組み合わせる肝疾患診断を行う。これらの診断法は種々の肝疾患の可能性のある患者をスクリーニングしたり、慢性肝炎から肝硬変、原発性肝癌へと肝疾患が悪化する場合のモニタリングに使用されることが多い。

【0008】

しかしながら、このように肝疾患に関する検査は数多く存在するものの、肝疾患が悪化する可能性を予測するための検出テストは存在しなかった。

【0009】**【発明が解決しようとする課題】**

そこで本発明では慢性肝疾患から肝硬変、原発性肝癌へと移行する可能性の高い患者を予め予見し、対策を講じることにより肝疾患の悪化を押さえる為に、肝疾患悪化の可能性が高い患者を早期に把握することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】
本発明者は、上記課題を解決するために検討を行った結果、血

mentioned.

Moreover there is also a test by the ultrasonic echo, the liver biopsy, and the laparoscope as a direct thing more.

And these tests are combined and a hepatic-disorders diagnosis is performed.

These diagnostics screens the patient with the possibility of various hepatic disorders.

It uses to a monitoring in case hepatic disorders aggravate from the chronic hepatitis to a liver cirrhosis and a primary hepatic carcinoma in many cases.

[0008]

However, many tests about hepatic disorders exist in this way.

However, the detection test for estimating possibility that hepatic disorders aggravate did not exist.

[0009]**[PROBLEM ADDRESSED]**

Then the patient with in this invention high possibility of transferring from chronic hepatic disorders to a liver cirrhosis and a primary hepatic carcinoma is foreseen previously, and a countermeasure is devised. In order to thus suppress aggravation of hepatic disorders, the patient with the high possibility of hepatic-disorders aggravation is grasped in its early stages. This is subjected.

[0010]**[SOLUTION OF THE INVENTION]**

This inventor examined, in order to solve an above subject.

As a result, the correlation between soluble

清中の可溶性 Fas 抗原濃度と肝疾患との間の関連性を見いだし本発明に至った。すなわち、本発明は、血中の可溶性 Fas 抗原の濃度を測定することを特徴とする肝疾患群の評価法である。肝疾患群には、慢性肝炎、肝硬変及び原発性肝癌が含まれる。

【0011】

前記の評価は、評価対象者の血中の可溶性 Fas 抗原の濃度を、肝疾患患者及び／または正常人について収集された血中の可溶性 Fas 抗原濃度と比較することにより行うことができる。

【0012】

前記評価は、肝疾患の罹患危険率の決定として、あるいは肝疾患の進行の危険率の決定として行うことができる。後記実施例に示すように、肝疾患患者について血清中の可溶性 Fas 抗原の濃度を測定したところ、慢性肝炎では 25%、肝硬変では 33%、原発性肝癌患者では 50% が有意に可溶性 Fas 抗原の血中濃度が高かった。従って、血中の可溶性 Fas 抗原を測定することにより、肝疾患の罹患の危険率を決定することができる。また、肝疾患の進行の危険率を決定することもできる。肝疾患の進行には、慢性肝炎から肝硬変、慢性肝炎から原発性肝癌、肝硬変から原発性肝癌への移行がある。

Fas antigen concentration in blood serum and the hepatic disorders is found out. It led in this invention.

That is, this invention measures concentration of blood soluble Fas antigen.

It is the evaluation method of the hepatic-disorders group characterized by the above-mentioned.

The chronic hepatitis, a liver cirrhosis, and a primary hepatic carcinoma are contained in a hepatic-disorders group.

[0011]

The above-mentioned evaluation can be carried out by comparing concentration of blood soluble Fas antigen of an evaluation subject with blood soluble Fas antigen concentration collected about the patient with hepatic disease and/or the normal human.

[0012]

The above-mentioned evaluation can be carried out as determination of the level of significance of the advance of hepatic disorders as determination of the sickness level of significance of hepatic disorders.

As shown in the after-mentioned Example, concentration of soluble Fas antigen in a blood serum was measured about the patient with hepatic disease. In the chronic hepatitis, the blood level of soluble Fas antigen had 25 significantly high%. In the liver cirrhosis, the blood level of soluble Fas antigen had 33 significantly high%. In the primary hepatic-carcinoma patient, the blood level of soluble Fas antigen had 50 significantly high%.

Therefore, the level of significance of a sickness of hepatic disorders can be determined by measuring blood soluble Fas antigen.

Moreover, the level of significance of advance of hepatic disorders can also be determined.

There are transfers from the chronic hepatitis to a liver cirrhosis, from the chronic hepatitis to a primary hepatic carcinoma and from the liver

cirrhosis to a primary hepatic carcinoma in advance of hepatic disorders.

【 0 0 1 3 】**【発明の実施の形態】**

次に、本発明の実施の態様を説明する。本発明の方法は、血中の可溶性 F a s 抗原の濃度を測定することにより行われる。検体としては、血清、血漿、全血、濾紙血、または、唾液が用いられるが、可溶性物質を含む分画物を用いても良い。

【 0 0 1 4 】

可溶性 F a s 抗原の濃度の測定の方法は、特に制限されず、絶対値として測定しても、標準物質に対する相対値としても良い。具体的には、可溶性 F a s 抗原に対する抗体を用いた R I A (放射免疫測定)、E I A (酵素免疫測定)、F I A (傾向免疫測定)、C L I A (化学発光免疫測定)、C L E I A (化学発光酵素免疫測定) または、免疫凝集法等、通常の免疫測定法が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

前記抗体は、例えば、可溶性 F a s 抗原でマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、モルモット、ヒツジなどの動物を免疫することにより、これらの動物から抗血清として、得られる。得られた血清をさらにイムノグロブリン、または I g G に精製してもよく、さらに、可溶性 F a s などを持ちいてアフィニティー精製

[0013]**[Embodiment]**

Next, the aspect of implementation of this invention is explained.

The method of this invention is performed by measuring concentration of blood soluble Fas antigen.

As a test substance, a serum, plasma, a whole blood, filter-paper blood, or a saliva is used.

However, the fraction containing a soluble substance may be used.

[0014]

Particularly the method of a measurement of the concentration of soluble Fas antigen is not limited. It may measure as an absolute value. It is good also as relative value with respect to a standard substance.

Specifically, usual immunoassay, such as RIA (radioimmunoassay), EIA (enzyme immunoassay), FIA (fluorescence immunoassay), CLIA (chemiluminescence immunoassay), CLEIA (chemiluminescence enzyme immunoassay) or the immune-aggregation method using the antibody with respect to soluble Fas antigen, is mentioned.

[0015]

The above-mentioned antibody is obtained from these animals as an antiserum, for example, by immunizing animals, such as a mouse, a rat, a rabbit, a goat, a guinea pig, and a sheep, with soluble Fas antigen.

The obtained blood serum may be further purified by the immuno-globulin or IgG. Furthermore, affinity purification may be carried out using soluble Fas etc.

Soluble Fas antigen used for immunity may be purified from a human blood serum etc.

してもよい。免疫に用いる可溶性 Fas 抗原は、人血清などから精製してもよいが、遺伝子組み替え技術を用いて大腸菌や培養細胞から得ることもできるし、アミノ酸配列の一部または全部を含む合成ペプチドも使用可能である。

【0016】

また、抗体としてモノクローナル抗体を調製しても良い。例えば、可溶性 Fas で免疫したマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞と細胞融合させてハイブリドーマを調製し、得られたハイブリドーマから可溶性 Fas 抗原に結合する抗体を産生する株式会社を選択し、得られた株を好適な培地で培養すると、培養液中に可溶性 Fas 抗原に対するモノクローナル抗体が産生される。尚、免疫測定法としてサンドイッチ法を用いる場合には、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を組み合わせて用いるか、あるいは異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体を用意する。このような抗体として、(株)医学生物学研究所から市販されている抗 Fas 抗体も使用可能である。

【0017】

予め同定されている肝疾患患者及び正常者について上記のようにして中の可溶性 Fas 抗原濃度を測定しておき得られたデータと、評価対象者の血中可溶性 Fas 抗原濃度を比較し、評価を行う。

However, it can also obtain from an *Escherichia coli* or a culture cell using a gene-recombination technique.

The synthetic peptide containing the part or all of an amino acid sequence can also be used.

[0016]

Moreover, a monoclonal antibody may be prepared as an antibody.

For example, the cell fusion of the spleen cell of the mouse which immunized by soluble Fas is carried out to a myeloma cell, and a hybridoma is prepared.

K.K. which produces the antibody bound to soluble Fas antigen from the obtained hybridoma is selected.

If the obtained strain is cultured by the suitable medium, the monoclonal antibody with respect to soluble Fas antigen will be produced in a culture solution.

In addition, in using a sandwich method as immunoassay, it combines and uses a monoclonal antibody and a polyclonal antibody.

Or 2 kinds of monoclonal antibodies which recognize a different epitope are prepared.

As such an antibody, the anti- Fas antibody marketed from Medical Biological Laboratories Co., Ltd. can also be used.

[0017]

About the patient with hepatic disease and the normal person who are identified previously, inner soluble Fas antigen concentration is measured as mentioned above. The obtained data and blood soluble Fas antigen concentration of an evaluation subject are compared.

It evaluates.

【0018】

【実施例】

対象には慢性肝炎12例、肝硬変15例、原発性肝癌34例、健康人40例の血清を用いた。

【0019】

血清中可溶性Fas抗原は、Fas抗原の細胞外ドメインの異なるエピトープに対する2種類のモノクローナル抗体を使用したサンドイッチELISA法により測定した。可溶性Fas抗原濃度は、可溶性Fas抗原cDNAを組み込んだ発現ベクターを導入したCOS-7細胞の培養上清から、可溶性Fas抗原の標準直線を作成して求めた。

【0020】

【測定結果】

結果は表1の通りであった。Mann-Whitney's U-testではそれぞれの肝疾患群では有意差はみられなかったが、健康人と各肝疾患との間にはいずれも有意差($p < 0.001$)が認められた。次に可溶性抗原の陽性率を求めると、健康人の平均 $\pm 3SD$ ($= 0.97 \text{ ng/ml}$)を越える症例は表2の通りであった。この結果より特に原発性肝癌において可溶性Fas抗原の陽性率が高かった。

【0021】

[0018]

[Example]

The blood serum of 12 chronic hepatitis, 15 liver cirrrosises, 34 primary hepatic carcinomas, and 40 healthy subjects was used for the object.

[0019]

Soluble Fas antigen was measured in the blood serum by the sandwich ELISA method which used 2 kinds of monoclonal antibodies with respect to the epitope with different the extra-cellular domain of Fas antigen.

Soluble Fas antigen concentration created and calculated the standard straight line of soluble Fas antigen from the culture supernatant liquid of COS-7 cell which introduced the expression vector incorporating soluble Fas antigen cDNA.

[0020]

[Measurement result]

The result was as Table 1.

By each hepatic-disorders group, the significant difference was not seen at Mann-Whitney's U-test.

However, between a healthy subject and each hepatic disorders, the significant difference ($p < 0.001$) observed by each.

Next when calculated for the rate of positive of the soluble antigen, the case which exceeds average $\pm 3SD$ ($= 0.97 \text{ ng/ml}$) of a healthy subject was as Table 2.

In particularly the primary hepatic carcinoma, the rate of positive of soluble Fas antigen was higher than this result.

[0021]

【表 1】

[Table 1]

表 1 各種肝疾患での可溶性Fas抗原値

慢性肝炎	0.96 ± 0.76(0.31～ 3.01)ng/ml
肝硬変	1.26 ± 1.45(0.20～ 5.21)ng/ml
原発性肝癌	2.69 ± 3.48(0.03～12.50)ng/ml
健常人	0.22 ± 0.25(0.0 ～ 1.33)ng/ml

Table 1 Soluble Fas antigen values in various hepatic disorders

Column (top to bottom): Chronic hepatitis, Liver cirrhosis, Primary hepatic carcinoma, Healthy subject

【 0 0 2 2 】

[0022]

【表 2】

[Table 2]

表 2 各種肝疾患での陽性率

慢性肝炎	3/12 (25%)
肝硬変	5/15 (33%)
原発性肝癌	17/34 (49%)

Table 2 Rate of positive in various hepatic disorders

Column (top to bottom): Chronic hepatitis, Liver cirrhosis, Primary hepatic carcinoma

【 0 0 2 3 】

[0023]

【発明の効果】

以上より、慢性肝炎、肝硬変、原発性肝癌では健常人より血中可溶性 Fas 抗原が有意に増加しており、特に原発性肝癌の 5

[EFFECT OF THE INVENTION]

As mentioned above, in the chronic hepatitis, a liver cirrhosis, and a primary hepatic carcinoma, a blood soluble Fas antigen is increasing from a healthy subject significantly. Particularly, 50% of the primary hepatic carcinoma showed soluble

0%が可溶性Fas抗原陽性を示した。白血病患者では血中可溶性Fas抗原レベルの上昇が報告されており、腫瘍細胞や変異細胞が、Fasリガンド陽性細胞などの免疫学的監視機構から逃れるメカニズムの一つとして可溶性Fas抗原が機能していることが考えられる。従って各種肝疾患における血中可溶性Fas抗原の測定が原発性肝癌の早期診断または肝疾患進行の危険群の発見に役立ち、その測定意義は臨床的に重要である。

Fas antigen-positive.

The raise of a blood soluble Fas antigen level is reported by the leukemia patient. It can think of that soluble Fas antigen is functioning as one of the mechanisms in which a tumor cell and a variant cell escape immunological-surveillance mechanisms, such as Fas ligand positive cell.

Therefore a measurement of the blood soluble Fas antigen in various hepatic disorders is useful to an early diagnosis of a primary hepatic carcinoma, or a discovery of the danger group of hepatic-disorders advance. The measurement meaning is clinically important.



DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

["WWW.DERWENT.CO.UK"](http://WWW.DERWENT.CO.UK) (English)

["WWW.DERWENT.CO.JP"](http://WWW.DERWENT.CO.JP) (Japanese)